

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 777 283

②① N° d'enregistrement national :

98 04559

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 07 K 14/605, A 61 K 38/26

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 10.04.98.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 15.10.99 Bulletin 99/41.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : ADIR ET COMPAGNIE — FR.

⑦② Inventeur(s) : CALAS BERNARD, GRASSY  
GERARD, CHAVANIEU ALAIN, SARRAUSTE DE  
MENTHIERE CYRIL, RENARD PIERRE, PFEIFFER  
BRUNO et MANECHEZ DOMINIQUE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ NOUVEAUX COMPOSES PEPTIDIQUES ANALOGUES DU GLUCAGON-PEPTIDE- 1 (7-37), LEUR PROCEDE  
DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT.

⑤⑦ Composés peptidiques de formule (I):

$Z_1 - X_1 - X_2 - X_3 - Gly - Thr - Ser - X_4 - X_5 - Ser - X_6 - X_7 -$   
 $X_8 - Glu - Gly - Gln - Ala - X_9 - Lys - X_{10} - X_{11} - X_{12} - Ala -$   
 $X_{13} - X_{14} - Val - Lys - Gly - X_{15} - Gly - Z_2$   
dans laquelle:

$Z_1$ , substituant du groupement aminé terminal, repré-  
sente un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle, acy-  
le, ou bien un groupement arylcarbonyle,  
hétéroarylcabonyle, arylalkylcarbonyle, hétéroarylcabony-  
le, aryloxycarbonyle, arylalkyloxycarbonyle, alkyloxycarbo-  
nyle, tous éventuellement substitués,

$Z_2$ , substituant du groupement carbonyle terminal, re-  
présente un groupement hydroxy, alkoxy, amino éventuelle-  
ment substitué,

$X_1$  à  $X_{14}$  représentent chacun un résidu d'acide aminé  
de configuration D ou L tel que défini dans la description,

$X_{15}$  représente une liaison ou un résidu Arginine (Arg).  
Médicaments.

FR 2 777 283 - A1



La présente invention concerne de nouveaux composés peptidiques analogues du Glucagon-Like-Peptide-1 (7-37), leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques qui les contiennent.

Les Glucagon-Like-Peptides-1 (7-37) et (7-36) NH<sub>2</sub> ('GLP-1) sont des peptides d'origine intestinale, fortement impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Ces peptides sont les principaux médiateurs de l'axe entéro-insulaire et agissent en se fixant à des récepteurs spécifiques.

Le 'GLP-1 agit de manière prépondérante au niveau pancréatique en exerçant un effet puissant de stimulation de l'insulino-sécrétion par les cellules  $\beta$ , de manière glucose dépendante (S. Mojsov et al., J. Clin. Invest., 1987, 79, 619 ; et J.J. Holst, F.E.B.S. Letters, 1987, 211, 169). Cette stimulation s'accompagne d'une stimulation de la libération de somatostatine et d'une inhibition de la libération de glucagon.

Parallèlement à ces effets pancréatiques, le 'GLP-1 a pour effet de ralentir la vidange gastrique, de diminuer les sécrétions acides et de stimuler l'utilisation périphérique du glucose au niveau musculaire, hépatique, et adipocytaire (M.L. Villanueva et al., Diabetologia, 1994, 37, 1163 ; D.J. Drucker, Diabetes, 1998, 47, 159).

Des études récentes ont également montré que le 'GLP-1 pouvait avoir une influence sur le comportement alimentaire en inhibant la prise de nourriture et de boisson, par action sur les centres de la satiété (M.D. Turton et al., Nature, 1996, 379, 69).

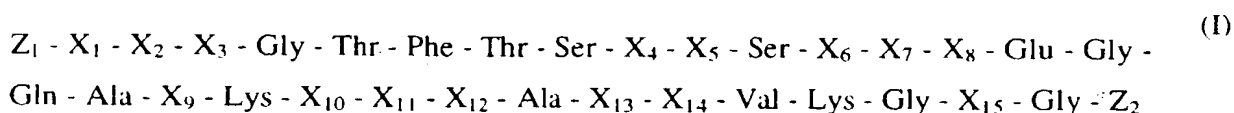
Le 'GLP-1 possède donc de multiples applications thérapeutiques potentielles, en particulier dans le traitement du diabète de type II, non insulino-dépendant, de l'obésité, et dans certains cas de diabète de type I.

Toutefois, comme beaucoup de peptides hormonaux, il possède une demi-vie plasmatique assez courte, inférieure à 2 minutes (T.J. Kieffer et al., Endocrinology, 1995, 136, 3585), ce qui limite son utilisation.

L'utilisation du peptide naturel GLP<sub>1</sub> (7-37) pour ses propriétés insulino-tropiques a été largement décrite, que ce soit pour le peptide naturel GLP<sub>1</sub> (7-37) ou GLP<sub>1</sub> (7-36) NH<sub>2</sub> seul, sous forme de sels, esters ou amides (US 5616492, WO 8706941, WO 9011296), associé à des phospholipides (WO 9318785) ou associé à d'autres substances hypoglycémiantes (WO 9318786). Des analogues modifiés en quelques positions de la séquence naturelle ont également été étudiés (EP 733644, EP 708179, EP 658568, WO 9111457) dans le but de concevoir des dérivés aussi puissants que le GLP<sub>1</sub> (7-37) et mieux absorbés.

Les composés de la présente invention possèdent une structure originale dérivant de celle du 'GLP-1 par modifications de plusieurs résidus et/ou par suppression de l'arginine en position 36. Outre le fait qu'ils soient nouveaux, ces composés possèdent des propriétés pharmacologiques intéressantes, dues à leur caractère agoniste pour les récepteurs au 'GLP-1. Les modifications  
 5 apportées présentent de plus l'avantage d'augmenter considérablement la stabilité métabolique des composés de l'invention leur conférant ainsi une durée d'action supérieure au peptide naturel. Ces propriétés rendent ces dérivés particulièrement intéressant pour le traitement des pathologies liées au 'GLP-1, notamment dans le traitement du diabète de type II non insulino-dépendant, de l'obésité, et dans certains cas de diabète de type I.

10 La présente invention concerne les composés peptidiques de formule générale (I) :



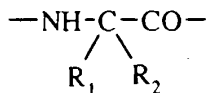
dans laquelle :

15  $Z_1$ , substituant du groupement aminé terminal du peptide de formule (I), représente un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, un groupement acyle ( $C_1-C_6$ ) linéaire ou ramifié, un groupement arylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylcabonyle éventuellement substitué, arylalkylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylalkylcarbonyle éventuellement substitué, aryloxy carbonyle éventuellement substitué, arylalkyloxy carbonyle éventuellement substitué, ou alkyloxy carbonyle éventuellement substitué,

20  $Z_2$ , substituant du groupement carbonyle terminal du peptide de formule (I), représente un groupement hydroxy, alkoxy ( $C_1-C_6$ ) linéaire ou ramifié, amino (éventuellement substitué par un ou deux groupements identiques ou différents choisis parmi alkyle ( $C_1-C_6$ ) linéaire ou ramifié, aryle éventuellement substitué, hétéroaryle éventuellement substitué, arylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylcabonyle éventuellement substitué, arylalkylcarbonyle  
 25 éventuellement substitué, hétéroarylalkylcarbonyle éventuellement substitué, ou par deux groupements formant avec l'atome d'azote un cycle saturé de 5 à 7 chaînons).

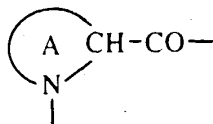
$X_1$  à  $X_{14}$  représentent chacun indépendamment :

- un résidu d'acide aminé naturel ou non naturel de configuration D ou L de formule :



dans laquelle :

- 5      –  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente un atome d'hydrogène ou un  
groupe-ment alkyle, aminoalkyle (éventuellement substitué sur l'atome d'azote par un  
ou deux groupe-ments alkyle, phényle, benzyle, cycloalkyle, aryloxy-carbonyl  
éventuellement substitué, arylalkyloxy-carbonyl éventuellement substitué,  
alkyloxy-carbonyl éventuellement substitué), thioalkyle (éventuellement substitué sur  
10 l'atome de soufre par un groupe-ment alkyle, phényle, benzyle, cycloalkyle),  
hydroxyalkyle (éventuellement substitué sur l'atome d'oxygène par un groupe-ment  
alkyle, phényle, benzyle, cycloalkyle), carboxyalkyle, carbamoylalkyle,  
guanidinoalkyle, cycloalkyle, cycloalkylalkyle, cycloalkyle fusionné éventuellement  
substitué, aryle éventuellement substitué, arylalkyle éventuellement substitué,  
15 hétéroaryle éventuellement substitué, hétéroarylalkyle éventuellement substitué,  
imidazolyle, imidazolylalkyle.
- ou bien  $R_1$  et  $R_2$  forment ensemble avec l'atome de carbone qui les porte un  
groupe-ment cycloalkyle ou cycloalkyle fusionné.
- 20      • ou un résidu d'acide aminé cyclique naturel ou non naturel de configuration D ou L, de  
formule :



dans laquelle A forme avec les atomes d'azote et de carbone auxquels il est relié un  
groupe-ment mono ou bicyclique de 5 à 11 chaîons saturé, partiellement insaturé ou  
insaturé, éventuellement substitué.

- 25      • ou un résidu de l'acide 3-amino-3-(2-furyl)propanoïque,

X<sub>15</sub> représente une liaison ou un résidu arginine (Arg).

leurs sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

à la condition que :

X<sub>15</sub> représente une liaison lorsque :

- 5 X<sub>1</sub> est un résidu de configuration L ou D choisi parmi tyrosine (Tyr), arginine (Arg), phénylalanine (Phe), ornithine (Orn), methionine (Met), proline (Pro), leucine (Leu), valine (Val), isoleucine (Ile), alanine (Ala), acide aspartique (Asp), acide glutamique (Glu), asparagine (Asn), glutamine (Gln), histidine (His).

et/ou

- 10 X<sub>2</sub> représente un résidu de configuration L ou D choisi parmi serine (Ser), glycine (Gly), cystéine (Cys), sarcosine (Sar), alanine (Ala), proline (Pro), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), threonine (Thr).

et/ou

- 15 X<sub>3</sub> représente un résidu d'acide aminé de configuration L ou D choisi parmi glutamine (Gln), acide aspartique (Asp), thréonine (Thr), asparagine (Asn), acide glutamique (Glu).

et/ou

X<sub>5</sub> représente un résidu tyrosine (Tyr).

et/ou

X<sub>6</sub> représente un résidu lysine (Lys).

- 20 et/ou

X<sub>10</sub> représente un résidu d'acide aminé choisi parmi glutamine (Gln), alanine (Ala), thréonine (Thr), sérine (Ser), glycine (Gly).

et/ou

X<sub>13</sub> représente un résidu d'acide aminé choisi parmi phénylalanine (Phe), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), alanine (Ala), tyrosine (Tyr).

étant entendu que :

- les résidus X<sub>1</sub> à X<sub>15</sub> ne peuvent être choisis de telle façon que le peptide obtenu soit identique au peptide naturel.
- le terme alkyle désigne une chaîne linéaire ou ramifiée de 1 à 6 atomes de carbones.
- le terme cycloalkyle représente un groupement cyclique carboné, saturé de 3 à 8 chaînons.
- l'expression "cycloalkyle fusionné" désigne un groupement bicyclique de 8 à 11 chaînons, composé d'un cycle saturé carboné fusionné avec un cycle saturé ou insaturé comportant éventuellement un ou deux hétéroatomes choisis parmi azote, oxygène ou soufre, par exemple un groupement indane, tétrahydronaphtalène ou tétrahydroquinoléine.
- le terme aryle représente un groupement phényle, naphtyle ou biphényle.
- le terme hétéroaryle représente un groupement mono ou bicyclique de 5 à 11 chaînons contenant de 1 à 4 hétéroatomes choisis parmi azote, oxygène ou soufre, par exemple un groupement furyle, pyridyle, thiényle ou indolye.
- le terme arylcarbonyle représente un groupement R<sub>a</sub>-CO-, le terme arylalkylcarbonyle représente un groupement R<sub>a</sub>-R<sub>b</sub>-CO-, le terme hétéroarylcarbonyle représente un groupement R<sub>c</sub>-CO-, et le terme hétéroarylalkylcarbonyle représente un groupement R<sub>c</sub>-R<sub>b</sub>-CO-, le terme aryloxycarbonyle représente un groupement R<sub>a</sub>-O-CO-, le terme arylalkyloxycarbonyle représente un groupement R<sub>a</sub>-R<sub>b</sub>-O-CO- et le terme alkyloxycarbonyle représente un groupement R<sub>b</sub>-O-CO-, dans lesquels R<sub>a</sub> représente un groupement aryle tel que défini précédemment, R<sub>b</sub> un groupement alkyle tel que défini précédemment et R<sub>c</sub> un groupement hétéroaryle tel que défini précédemment.
- le terme substitué affecté aux expressions précédemment définies, signifie que les groupements concernés sont substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène, ou groupement alkyle (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou ramifié, hydroxy, alkoxy (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou ramifié, amino, cyano, nitro, perhalogénoalkyle (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou ramifié.

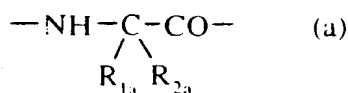
- chaque liaison peptidique  $-\text{CO}-\text{NH}-$  peut être éventuellement remplacée par une liaison pseudo-peptidique choisie parmi  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-$ ,  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_3)-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{SO}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ .

5 Parmi les acides pharmaceutiquement acceptables, on peut citer les acides chlorhydrique, bromhydrique, sulfurique, phosphonique, acétique, trifluoroacétique, lactique, pyruvique, malonique, succinique, glutarique, fumarique, tartrique, maléique, citrique, ascorbique, méthanesulfonique, camphorique, etc...

Parmi les bases pharmaceutiquement acceptables, on peut citer l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, la triéthylamine, la tertbutylamine, etc...

- 10 La présente invention concerne particulièrement les composés peptidiques de formule (I), pour lesquels les résidus  $\text{X}_1$  à  $\text{X}_{14}$  sont choisis en fonction de la nature de leur chaîne latérale. Ces composés sont représentés par les dérivés de formule (I) pour lesquels les résidus  $\text{X}_1$  à  $\text{X}_{14}$  pris  
15 séparément, soit possèdent une chaîne latérale à caractère aromatique, soit possèdent une chaîne latérale à caractère aliphatique, soit une chaîne latérale capable d'établir des interactions de type liaison hydrogène, soit une chaîne latérale capable d'établir des interactions ioniques, soit une chaîne latérale de nature cyclique.

Les résidus d'acides aminés naturels ou non naturels, de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale à caractère aromatique sont représentés par la formule suivante :

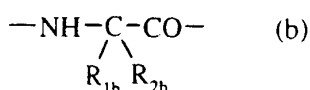


- 20 dans laquelle :

$\text{R}_{1a}$  représente un atome d'hydrogène, et  $\text{R}_{2a}$  représente un groupement cycloalkyle fusionné avec un cycle insaturé tel que défini précédemment, et éventuellement substitué, ou un groupement aryle éventuellement substitué, arylalkyle éventuellement substitué, hétéroaryle éventuellement substitué, hétéroarylalkyle éventuellement substitué, imidazolyle,  
25 imidazolylalkyle.

parmi ces résidus possédant une chaîne latérale à caractère aromatique on peut citer plus spécifiquement les résidus phénylalanine (Phe), histidine (His), tyrosine (Tyr), tryptophane (Trp), homophénylalanine (Hof), halogénophénylalanine (par exemple 4-chlorophénylalanine (4-Cl-Phe)), dihalogénophénylalanine (par exemple 3,4-dichlorophénylalanine (3,4-di-Cl-Phe)), alkylphénylalanine (par exemple 4-méthylphénylalanine (4-Me-Phe)), nitrophénylalanine (par exemple 4-nitrophénylalanine (4-NO<sub>2</sub>-Phe)), 3-pyridylalanine (3-Pya), 2-thiénylalanine (Tha), 2-furylalanine (Fua), 1-naphtylalanine (1-Nal), 2-naphtylalanine (2-Nal), phénylglycine (Phg), 3-nitrotyrosine (3-NO<sub>2</sub>-Tyr).

- Les résidus d'acides aminés naturels ou non naturels, de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale à caractère aliphatique sont représentés par la formule suivante :

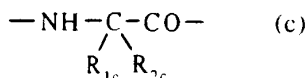


dans laquelle :

R<sub>1b</sub> représente un atome d'hydrogène, et R<sub>2b</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement alkyl, cycloalkyle.

parmi ces résidus on peut citer plus spécifiquement les résidus glycine (Gly), alanine (Ala), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), acide 2-aminobutyrique (Abu), 2-aminoisobutyrique (Aib), β-cyclohexylalanine (Cha), homoleucine (Hol), norleucine (Nle), norvaline (Nva), leucine (Tle).

- Les résidus d'acides aminés naturels ou non naturels, de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale capable d'établir des interactions de type liaison hydrogène sont représentés par la formule :



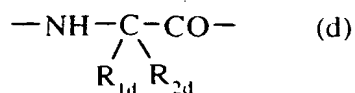
dans laquelle :



R<sub>1c</sub> représente un atome d'hydrogène, et R<sub>2c</sub> représente un groupement aminoalkyle (éventuellement substitué sur l'atome d'azote par un groupement alkyle, phényle, benzyle, ou cycloalkyle), thioalkyle (éventuellement substitué sur l'atome de soufre par un groupement alkyle, phényle, benzyle, ou cycloalkyle) hydroxylalkyle éventuellement substitué sur l'atome d'oxygène par un groupement alkyle, phényle, benzyle, cycloalkyle), carboxyalkyle, carbamoylalkyle, guanidinoalkyle.

parmi ces résidus on peut citer plus spécifiquement les résidus méthionine (Met), acide aspartique (Asp), acide glutamique (Glu), lysine (Lys), arginine (Arg), sérine (Ser), thréonine (Thr), cystéine (Cys), tyrosine (Tyr), asparagine (Asn), glutamine (Gln), tryptophane (Trp), acide diaminobutyrique (Dab), acide diaminopropionique (Dapa), ornithine (Orn), benzylcystéine (Bcy).

- Les résidus d'acides aminés naturels ou non naturels, de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale capable d'établir des interactions de type ionique sont représentés par la formule :

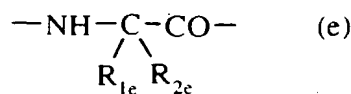


dans laquelle :

R<sub>1d</sub> représente un atome d'hydrogène, et R<sub>2d</sub> représente un groupement aminoalkyle, thioalkyle, hydroxyalkyle, carboxyalkyle, guanidinoalkyle, imidazolyle, imidaolylalkyle.

parmi ces résidus on peut citer plus spécifiquement les résidus acide aspartique (Asp), acide glutamique (Glu), lysine (Lys), arginine (Arg), histidine (His), sérine (Ser), thréonine (Thr), cystéine (Cys), tyrosine (Tyr), acide diaminoacétique (NH-Gly), acide diaminobutyrique (Dab), acide diaminopropionique (Dapa), ornithine (Orn).

- Les résidus d'acides aminés non naturels, de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale de nature cyclique sont représentés par la formule suivante :

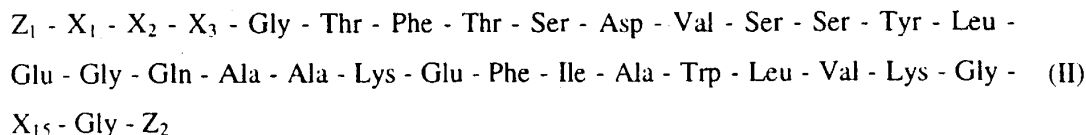


dans laquelle :

R<sub>1e</sub> et R<sub>2e</sub> forment ensemble un cycloalkyle ou un cycloalkyle fusionné.

5 parmi ces résidus on peut citer plus spécifiquement les résidus acide 1-amino-1-cyclohexanecarboxylique (Acy), acide 2-aminoindane-2-carboxylique (Aic), acide 2-aminotétraline-2-carboxylique (Ate).

La présente invention concerne préférentiellement les composés peptidiques de formule (II) :

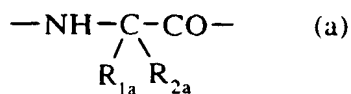


10 dans laquelle :

15 Z<sub>1</sub>, substituant du groupement aminé terminal du peptide de formule (I), représente un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, un groupement acyle (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou ramifié, un groupement arylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylcabonyle éventuellement substitué, arylalkylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylalkylcarbonyle éventuellement substitué, aryloxy carbonyle éventuellement substitué, arylalkyloxy carbonyle éventuellement substitué, ou alkyloxy carbonyle éventuellement substitué.

20 Z<sub>2</sub>, substituant du groupement carbonyle terminal du peptide de formule (I), représente un groupement hydroxy, alkoxy (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou ramifié, amino (éventuellement substitué par un ou deux groupements identiques ou différents choisis parmi alkyle (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) linéaire ou ramifié, aryle éventuellement substitué, hétéroaryle éventuellement substitué, arylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylcabonyle éventuellement substitué, arylalkylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylalkylcarbonyle éventuellement substitué, ou par deux groupements formant avec l'atome d'azote un cycle saturé de 5 à 7 chaînons).

25 X<sub>1</sub>, représente un résidu d'acide aminé naturel ou non naturel de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale à caractère aromatique, représenté par la formule suivante :

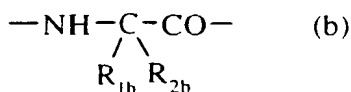


dans laquelle :

R<sub>1a</sub> représente un atome d'hydrogène, et R<sub>2a</sub> représente un groupement cycloalkyle fusionné avec un cycle insaturé tel que défini précédemment, et éventuellement substitué, ou un groupement aryle éventuellement substitué, arylalkyle éventuellement substitué, hétéroaryle éventuellement substitué, hétéroarylalkyle éventuellement substitué,

parmi ces résidus possédant une chaîne latérale à caractère aromatique on peut citer plus spécifiquement les résidus phénylalanine (Phe), histidine (His), tyrosine (Tyr), tryptophane (Trp), homophénylalanine (Hof), halogénophénylalanine (par exemple 4-chlorophénylalanine (4-Cl-Phe)), dihalogénophénylalanine (par exemple 3,4-dichlorophénylalanine (3,4-di-Cl-Phe)), alkylphénylalanine (par exemple 4-méthylphénylalanine (4-Me-Phe)), nitrophénylalanine (par exemple 4-nitrophénylalanine (4-NO<sub>2</sub>-Phe)), 3-pyridylalanine (3-Pya), 2-thiénylalanine (Tha), 2-furylalanine (Fua), 1-naphtylalanine (1-Nal), 2-naphtylalanine (2-Nal), phénylglycine (Phg), 3-nitrotyrosine (3-NO<sub>2</sub>-Tyr).

X<sub>2</sub>, représente un résidu d'acide aminé naturel ou non naturel de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale à caractère aliphatique, représenté par la formule suivante :

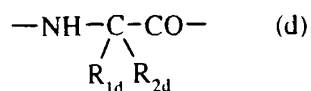


dans laquelle :

R<sub>1b</sub> représente un atome d'hydrogène, et R<sub>2b</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement alkyl, cycloalkyle,

parmi ces résidus on peut citer plus spécifiquement les résidus glycine (Gly), alanine (Ala), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), acide 2-aminobutyrique (Abu), 2-aminoisobutyrique (Aib), β-cyclohexylalanine (Cha), homoleucine (Hol), norleucine (Nle), norvaline (Nva), leucine (Tle).

X<sub>3</sub>, représente un résidu d'acide aminé naturel ou non naturel de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale capable d'établir des interactions ioniques, représenté par la formule suivante :



5 dans laquelle :

R<sub>1d</sub> représente un atome d'hydrogène, et R<sub>2d</sub> représente un groupement aminoalkyle, thioalkyle, hydroxyalkyle, carboxyalkyle, guanidinoalkyle, imidazolyle, imidaolylalkyle,

10 parmi ces résidus on peut citer plus spécifiquement les résidus acide aspartique (Asp), acide glutamique (Glu), lysine (Lys), arginine (Arg), histidine (His), sérine (Ser), thréonine (Thr), cystéine (Cys), tyrosine (Tyr), acide diaminoacétique (NH-Gly), acide diaminobutyrique (Dab), acide diaminopropionique (Dapa), ornithine (Orn).

X<sub>15</sub>, représente une liaison ou un résidu arginine,

étant entendu que les restrictions concernant les composés définis dans la formule (I) s'appliquent aux dérivés de formule (II).

15 Les composés préférés de l'invention sont les composés de formule (I) telle que définie précédemment, pour lesquels X<sub>15</sub> représente une liaison, et plus préférentiellement les composés de formule (II) telle que définie précédemment, pour lesquels X<sub>15</sub> représente une liaison.

20 L'invention s'étend également au procédé de préparation des composés de formule (I) qui peuvent être obtenus par différentes méthodes telles que la synthèse séquentielle sur phase solide, la synthèse et le couplage de fragments en solution, la synthèse enzymatique, ou en utilisant des techniques de biologie moléculaire.

Les méthodes générales de synthèse des peptides sur phase solide ont été décrites par B.W. Erickson et R.B. Merrifield ("The proteins", Solid. Phase Peptide Synthesis, 3<sup>ème</sup> édition, 1976, 257).

La synthèse sur phase solide est réalisée sur un automate qui effectue de façon répétitive et programmable des cycles de déprotection, couplage et lavages nécessaires à l'introduction séquentielle des acides aminés dans la chaîne peptidique.

5 L'acide aminé C-terminal est fixé sur une résine conventionnellement utilisée pour la préparation de polypeptides, de préférence un polystyrène réticulé à l'aide de 0.5 à 3.0 % de divinylbenzène et muni de restes activés qui permettent la fixation covalente du premier acide aminé sur la résine. Le choix approprié de la résine permet la formation après synthèse d'une fonction C-terminale acide carboxylique, amide, alcool ou ester.

10 Les acides aminés sont alors introduits un à un dans l'ordre déterminé par l'opérateur. Chaque cycle de synthèse correspondant à l'introduction d'un acide aminé, comporte une déprotection, N-terminale de la chaîne peptidique, des lavages successifs destinés à éliminer les réactifs ou à gonfler la résine, un couplage avec activation de l'acide aminé et de nouveaux lavages. Chacune de ces opérations est suivie d'une filtration réalisée grâce à la présence d'un verre fritté incorporé au réacteur dans lequel s'effectue la synthèse.

15 Les réactifs de couplage utilisés sont des réactifs classiques de la synthèse peptidique comme le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et l'hydroxybenzotriazole (HOBT) ou le benzotriazol-1-yl-oxytris (diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP) ou encore le diphénylphosphorylazide (DPPA).

Des activations par formation d'anhydrides mixtes ou symétriques sont également possibles.

20 Chaque acide aminé est introduit dans le réacteur 6 fois en excès environ, par rapport au degré de substitution de la résine et en quantité environ équivalent par rapport aux agents de couplage. La réaction de couplage peut être vérifiée à chaque étape de la synthèse par le test de réaction à la ninhydrine décrit par E. KAISER et Coll. (Anal. Biochem., 34, 595, 1970).

25 Après assemblage de la chaîne peptidique sur la résine, un traitement approprié, par exemple à l'aide d'un acide fort tel que l'acide trifluoroacétique, ou l'acide fluorhydrique en présence d'anisole, d'éthanedithiol ou de 2-méthylindole sert à séparer le peptide de la résine ainsi qu'à libérer le peptide de ses groupes protecteurs. Le composé est alors purifié par des techniques classiques de purification, notamment chromatographiques.

Les peptides de la présente invention peuvent être également obtenus par couplage en solution de fragments peptidiques sélectivement protégés, qui peuvent être préparés eux-mêmes soit sur phase solide, soit en solution. L'emploi des groupes protecteurs et la mise à profit de leur stabilité différentielle est analogue aux méthodes sur phase solide à l'exception de l'attachement de la chaîne peptidique sur la résine. Le groupe carboxylique C-terminal est protégé, par exemple, par un ester méthylique ou une fonction amide. Les méthodes d'activation lors des couplages sont également analogues à celles employées dans la synthèse sur phase solide.

Les peptides de la présente invention peuvent aussi être obtenus en utilisant des techniques de biologie moléculaire, en utilisant des séquences d'acide nucléique codant pour ces peptides. Ces séquences peuvent être des ARN ou des ADN et être associées à des séquences de contrôle et/ou insérées dans des vecteurs. Ces derniers sont ensuite transfectés dans des cellules hôtes, par exemple des bactéries. La préparation de ces vecteurs ainsi que leur production ou expression dans un hôte sont réalisées par les techniques classiques de biologie moléculaire et de génie génétique.

La synthèse de peptides contenant des liaisons pseudopeptidiques est effectuée soit par les méthodes en solution soit de façon combinée avec la synthèse sur phase solide en utilisant les méthodes classiques de la chimie organique. Ainsi, par exemple, l'introduction de la liaison  $-CH_2-NH$  se fait en préparant en solution l'aldéhyde Fmoc-NH-CHR-CHO selon la technique décrite par FEHRENTZ et CASTRO (Synthesis, 676-678, 1983) et en le condensant avec la chaîne peptidique croissante soit sur phase solide selon la technique décrite par SASAKI et COY (Peptides, 8, 119-121, 1988), soit en solution.

La présente invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques renfermant comme principe actif au moins un composé de formule générale (I) ou un de ses sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable, seul ou en combinaison avec un ou plusieurs excipients ou véhicules inertes, non toxiques.

Parmi les compositions pharmaceutiques selon l'invention, on pourra citer plus particulièrement celles qui conviennent pour l'administration orale, parentérale, nasale, les comprimés simples ou dragéifiés, les comprimés sublinguaux, les sachets, les paquets, les gélules, les suppositoires, crèmes, pommades, gels dermiques, dispositifs transdermiques, les aérosols, ampoules buvables et injectables...

La posologie varie selon l'âge et le poids du patient, la nature et la sévérité de l'affection ainsi que la voie d'administration.

Celle-ci peut être orale (incluant la voie inhalée, gingivale et sublinguale), nasale, rectale, parentérale ou transdermique. D'une manière générale, elle s'échelonne entre 10 µg et 500 mg pour un traitement en une ou plusieurs prises par 24 heures selon la voie d'administration et la forme galénique utilisée.

Les exemples suivants illustrent l'invention et ne la limitent en aucune façon.

Par convention dans les exemples ci-dessous, les acides aminés dont les abréviations commencent par une lettre majuscule sans aucune autre précision sont de configuration L. Les acides aminés de configuration D seront précédés du symbole : (D).

### **EXEMPLE 1 :**

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - (D)-Leu - Glu - Gly - Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Arg - Gly - NH<sub>2</sub>

Le composé de l'exemple 1 est synthétisé à l'échelle de 0.1 mmole à partir d'une résine Fmoc - PAL - PEG - PS (Perseptive, Framingham, USA), en utilisant un appareil en flux continu (Perseptive, model 9050 PepSynthesizer, Framingham, USA), en suivant le protocole répétitif suivant :

N° opération	Fonction	Solvant / Réactif	Temps
1	lavage	DMF	5 min
2	déprotection	20 % pipéridine/DMF	15 min
3	lavage	DMF	15 min
4	couplage	Acide aminé / DIPCDI / HOBt	60 min
5	lavage	20 % pipéridine / DMF	5 min
6	lavage	DMF	5 min
7	lavage	dichlorométhane	5 min

Chaque opération, effectuée à température ambiante, est suivie d'une filtration à travers un verre fritté incorporé à la cellule de verre (réacteur) dans laquelle la synthèse progresse. Le filtre retient la résine sur laquelle est fixée la chaîne peptidique croissante.

- 5 Chaque acide aminé (6 équivalents) est assemblé en utilisant la diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) en présence d'hydroxy-1-benzotriazole (HOBt) comme agent de couplage.

- 10 Après incorporation du dernier acide aminé, on obtient un peptide, protégé sur ses chaînes latérales et fixé sur la résine. Le support est alors séché sous vide poussé pendant 3 heures. Il est ensuite traité par 50 ml de réactif K (acide trifluoroacétique 82.5 %, phénol 5 %, eau 5 %, thioanisole 5 %, éthanedithiol 2.5 %). Le mélange est alors laissé à température ambiante avec agitation occasionnelle pendant 12 heures, puis filtré dans un erlen contenant environ 200 ml d'éther éthylique. Le peptide précipite, et est isolé par filtration ou centrifugation. Il est ensuite séché sous vide poussé en présence de pastilles de potasse pendant 12 heures, puis purifié par CLHP préparative sur colonne de phase inverse ( $C_{18}$ ) en utilisant un gradient eau-acétonitrile. Les fractions contenant le peptide sont rassemblées puis lyophilisées.

15 Spectre de masse : ESI - MS :  $m/z = 3356$

Les exemples suivants ont été préparés en utilisant le mode opératoire décrit dans l'exemple 1, en utilisant les acides aminés nécessaires.

20 **EXEMPLE 2 :**

Trp - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - (D)-Leu - Val - Lys - Gly - Arg - Gly -  
NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS :  $m/z = 3404$

25 **EXEMPLE 3 :**

Trp - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Arg - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS :  $m/z = 3404$



**EXEMPLE 4 :**

His - Ala - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Val - Leu - Glu - Gly -  
 Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Arg - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3290

5 **EXEMPLE 5 :**

His - Ala - His - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Val - Leu - Glu - Gly -  
 Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Arg - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3299

**EXEMPLE 6 :**

10 His - Ala - (D)-Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu -  
 Gly - Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3198

**EXEMPLE 7 :**

15 His - (D)-Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu -  
 Gly - Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3198

**EXEMPLE 8 :**

20 His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
 Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3198

**EXEMPLE 9 :**

His - Leu - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
 Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3241

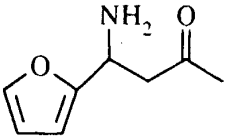
**EXEMPLE 10 :**

His - Val - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3227

5 **EXEMPLE 11 :**

Afp - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

avec Afp représentant  , résidu correspondant à l'acide 3-amino-3-(2-furyl)propanoïque

10 Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3197

**EXEMPLE 12 :**

His - Ala - Asp - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3184

15 **EXEMPLE 13 :**

His - Ala - Ser - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3156

**EXEMPLE 14 :**

20 His - Ala - Lys - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3198

**EXEMPLE 15 :**

Phe - (D)-Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Lys - Tyr - Leu - Glu -  
Gly - Gln - Ala - Val - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3278

**5      EXEMPLE 16 :**

Phe - (D)-Ala - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Val - (D)-Leu - Glu -  
- Gly - Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3143

**EXEMPLE 17 :**

10      His - Ala - Leu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3183

**EXEMPLE 18 :**

15      His - Ala - Met - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3201

**EXEMPLE 19 :**

20      His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Trp - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3238

**EXEMPLE 20 :**

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Ile - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3164

**EXEMPLE 21 :**

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Val - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3150

5 **EXEMPLE 22 :**

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - His - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3188

**EXEMPLE 23 :**

10 His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Asp - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3166

**EXEMPLE 24 :**

15 His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Leu - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3199

**EXEMPLE 25 :**

20 His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Val - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3184

**EXEMPLE 26 :**

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Tyr - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3245

**EXEMPLE 27 :**

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Arg - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3242

**5    EXEMPLE 28 :**

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Glu - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3214

**EXEMPLE 29 :**

10    Phe - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

Spectre de masse : ESI - MS : m/z = 3205

## ETUDE PHARMACOLOGIQUE

### **EXEMPLE A : Etude de liaison aux récepteurs du GLP-1**

Les études de liaison aux récepteurs du GLP-1 ont été réalisées en utilisant des membranes RIN T3 dans un tampon 60 mM Tris-HCl pH 7.5, contenant 4 % de BSA et 750 µg/ml de bacitracin. Les membranes (20 à 30 µg) sont incubées dans un volume final de 500 µl avec environ 15 fmol de [125I]-GLP-1 (50.000 cpm) et le compétiteur froid pendant 45 min à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 750 µl de tampon KRP froid, pH 7.5 contenant 3 % de BSA. Le milieu est centrifugé à  $12.000 \times g$  (4°C, 5 min). Le culot est resuspendu dans 1 ml de tampon KRP froid; sédimenté par une autre centrifugation et la radioactivité est mesurée. Les résultats sont exprimés en IC<sub>50</sub>.

#### **Résultats :**

Les résultats obtenus révèlent pour les composés de l'invention une très haute affinité pour les récepteurs du GLP-1.

C'est le cas notamment du composé de l'exemple 7 qui possède une affinité de l'ordre de  $10^{-10}$  M.

### **EXEMPLE B : Détermination du caractère agoniste ou antagoniste**

Le caractère agoniste des composés de l'invention a été déterminé en mesurant la production d'AMP cyclique après activation du récepteur par les différents produits à tester.

Des cellules RIN T3 sont cultivées pendant 6 jours et le milieu de culture est changé 1 jour avant l'expérience. Les cellules ( $3.10^5$  par puits) sont lavées deux fois avec du DMEM avant addition de 0.5 ml de DMEM contenant 1 % de BSA, 0.2 ml de IBMX et le peptide à tester. Après 20 minutes d'incubation à 25°C, l'AMPc intracellulaire est extrait, succinylé et quantifié par radioimmuno essai.

La valeur de référence à 100 % correspond à la production d'AMPc induite par une concentration de  $10^{-8}$  M de GLP-1 et la valeur à 0 % correspond à la production basale en l'absence de GLP-1. Les résultats sont exprimés en  $EC_{50}$  qui est la concentration qui induit 50 % de la production d'AMPc obtenue par une concentration de  $10^{-8}$  M de GLP-1.

5 **Résultats :**

Les composés de l'invention augmentent la production d'AMPc et ont des valeurs d' $EC_{50}$  nanomolaires ou subnanomolaires. A titre d'exemple, le composé de l'exemple 7 possède une  $EC_{50}$  de  $4.10^{-10}$  M.

**EXEMPLE C : Etude de la stimulation de la production d'insuline sur cellules en culture**

10 La stimulation de la production d'insuline induite par les composés de l'invention est étudiée sur des cellules Min6 ( $5 \times 10^5$  cellules par plaques dans 0.5 ml de milieu de culture). 18 heures avant l'expérience, le milieu de culture est pipeté et les cellules sont lavés deux fois avec du DRB pH 7.5 contenant 0.1 % de BSA. Les cellules sont alors préincubées pendant une heure dans du DRB-BSA contenant 1mM de glucose et ensuite incubées dans du DRB-BSA contenant  
15 différentes concentration de glucose et de composé à tester. Après incubation, le milieu est collecté, centrifugé pendant 5 minutes et stocké à  $-20^{\circ}C$ . La sécrétion d'insuline est déterminée par radioimmuno essai en utilisant de l'insuline porcine marquée à l'iode 125 et l'anticorps antiinsuline de Kervran de cochon d'Inde.

**Résultats :**

20 Les composés de l'invention sont capables de stimuler la sécrétion d'insuline de façon plus importante que le GLP-1.

**EXEMPLE D : Etude de la stabilité métabolique**

Les composés de l'invention (10  $\mu$ l de solution 1mM dans l'eau) sont incubés avec 200  $\mu$ l de sérum humain pendant 60 minutes à  $37^{\circ}C$ . Les réactions sont arrêtées par ajout de 20  $\mu$ l d'acide

trifluoroacétique. Les échantillons sont centrifugés et le surnageant est filtré à travers une cartouche Sep-Pak, préalablement activée et lavée avec 10 ml de méthanol, d'acétonitrile (80 % dans 0.1 % d'acide trifluoroacétique dans l'eau) et finalement avec 1 % d'acide trifluoroacétique dans l'eau. Après lavage des cartouches avec 20 ml d'acide trifluoroacétique à 0.1 % dans l'eau, les peptides fixés sont élués avec 2 ml d'acétonitrile (80 % dans 0.1 % d'acide trifluoroacétique dans l'eau). Les fractions acétonitriles sont alors lyophilisées, dissoutes dans l'eau et analysées par CLHP.

### Résultats :

Les composés de l'invention possèdent une stabilité métabolique supérieure à celle de l'hormone naturelle.

### EXEMPLE E : Activité antihyperglycémiant

L'activité antihyperglycémiant des dérivés de l'invention a été recherchée sur des rats mâles normaux Wistar d'environ 250 g âgés de trois mois.

L'homéostasie a été évaluée par un test de tolérance au glucose.

#### *. Test de tolérance au glucose par voie intraveineuse (IVGTT)*

Le glucose est dissout dans une solution aqueuse de NaCl à 0.9 % et administré par la voie de la veine saphène à des rats anesthésiés au pentobarbital (60 mg.kg<sup>-1</sup>, *IP*). Les échantillons de sang sont collectés séquentiellement par les vaisseaux de la queue avant et 2, 5, 10, 15, 20 et 30 minutes après l'injection du glucose. Ils sont ensuite centrifugés et le plasma est séparé. La concentration en glucose plasmatique est déterminée immédiatement sur un aliquot de 10 µl et le plasma restant est conservé à -20°C, jusqu'à la détermination de la concentration en insuline par radioimmuno essai.

Une injection unique en *iv* du produit à tester est effectuée à des rats à jeun anesthésiés au pentobarbital immédiatement après la charge en glucose selon le protocole décrit par Hendrick et al. (Metabolism, 1993, 42, 1).



**. Méthodes analytiques.**

La concentration en glucose plasmatique est déterminée par utilisation d'un analyseur de glucose (Beckman Inc., Fullerton, CA). La tolérance au glucose est mesurée par rapport à deux paramètres :  $\Delta G$  et K.

5  $\Delta G$  représente l'augmentation de la glycémie au dessus de la ligne de base, intégrée sur une période de 30 minutes, après surcharge en glucose à la dose de 1 g/kg.

K est la vitesse de disparition du glucose entre 5 et 30 minutes, après administration du glucose.

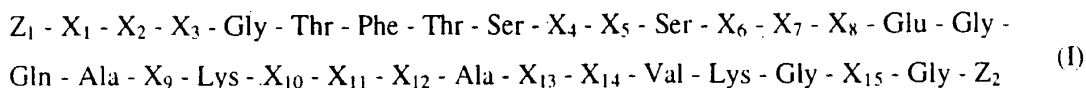
10 Il apparaît que les composés de l'invention ont une activité insulinosécrétrice et antihyperglycémiant équivalente ou supérieure à celle du  $GLP_1$  et présente une durée d'action supérieure qui reflète leur plus grande stabilité métabolique in vivo.

**EXEMPLE F : Composition pharmaceutique : soluté injectable**

Composé de l'exemple 7 .....	10 mg
Eau distillée pour préparations injectables .....	25 ml

## REVENDICATIONS

### 1. Composés peptidiques de formule générale (I) :



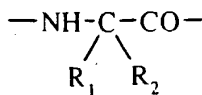
dans laquelle :

5  $\text{Z}_1$ , substituant du groupement aminé terminal du peptide de formule (I), représente un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, un groupement acyle ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) linéaire ou ramifié, un groupement arylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylcabonyle éventuellement substitué, arylalkylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylalkylcarbonyle éventuellement substitué, aryloxy carbonyle éventuellement substitué, arylalkyloxy carbonyle éventuellement substitué, ou alkyloxy carbonyle éventuellement substitué,

10  $\text{Z}_2$ , substituant du groupement carbonyle terminal du peptide de formule (I), représente un groupement hydroxy, alkoxy ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) linéaire ou ramifié, amino (éventuellement substitué par un ou deux groupements identiques ou différents choisis parmi alkyle ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) linéaire ou ramifié, aryle éventuellement substitué, hétéroaryle éventuellement substitué, arylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylcabonyle éventuellement substitué, arylalkylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylalkylcarbonyle éventuellement substitué, ou par deux groupements formant avec l'atome d'azote un cycle saturé de 5 à 7 chaînons).

$\text{X}_1$  à  $\text{X}_{14}$  représentent chacun indépendamment :

- un résidu d'acide aminé naturel ou non naturel de configuration D ou L de formule :

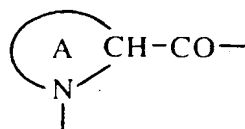


20

dans laquelle :

- 5      - R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène et R<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle, aminoalkyle (éventuellement substitué sur l'atome d'azote par un ou deux groupements alkyle, phényle, benzyle, cycloalkyle, aryloxy-carbonyl éventuellement substitué, arylalkyloxy-carbonyl éventuellement substitué, alkyloxy-carbonyl éventuellement substitué), thioalkyle (éventuellement substitué sur l'atome de soufre par un groupement alkyle, phényle, benzyle, cycloalkyle), hydroxyalkyle (éventuellement substitué sur l'atome d'oxygène par un groupement alkyle, phényle, benzyle, cycloalkyle), carboxyalkyle, carbamoylalkyle, guanidinoalkyle, cycloalkyle, cycloalkylalkyle, cycloalkyle fusionné éventuellement substitué, aryle éventuellement substitué, arylalkyle éventuellement substitué, hétéroaryle éventuellement substitué, hétéroarylalkyle éventuellement substitué.
- 10      - ou bien R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> forment ensemble avec l'atome de carbone qui les porte un groupement cycloalkyle ou cycloalkyle fusionné.

- 15      • ou un résidu d'acide amine cyclique naturel ou non naturel de configuration D ou L, de formule :



dans laquelle A forme avec les atomes d'azote et de carbone auxquels il est relié un groupement mono ou bicyclique de 5 à 11 chaînons saturé, partiellement insaturé ou insaturé, éventuellement substitué.

- 20      • ou un résidu de l'acide 3-amino-3-(2-furyl)propanoïque.

X<sub>15</sub> représente une liaison ou un résidu arginine (Arg).

leurs sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

à la condition que :

X<sub>15</sub> représente une liaison lorsque :

X<sub>1</sub> est un résidu de configuration L ou D choisi parmi tyrosine (Tyr), arginine (Arg), phénylalanine (Phe), ornithine (Orn), methionine (Met), proline (Pro), leucine (Leu), valine (Val), isoleucine (Ile), alanine (Ala), acide aspartique (Asp), acide glutamique (Glu), asparagine (Asn), glutamine (Gln), histidine (His),

5 et/ou

X<sub>2</sub> représente un résidu de configuration L ou D choisi parmi serine (Ser), glycine (Gly), cystéine (Cys), sarcosine (Sar), alanine (Ala), proline (Pro), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), threonine (Thr),

et/ou

10 X<sub>3</sub> représente un résidu d'acide aminé de configuration L ou D choisi parmi glutamine (Gln), acide aspartique (Asp), thréonine (Thr), asparagine (Asn), acide glutamique (Glu),

et/ou

X<sub>5</sub> représente un résidu tyrosine (Tyr),

et/ou

15 X<sub>6</sub> représente un résidu lysine (Lys),

et/ou

X<sub>10</sub> représente un résidu d'acide aminé choisi parmi glutamine (Gln), alanine (Ala), thréonine (Thr), sérine (Ser), glycine (Gly),

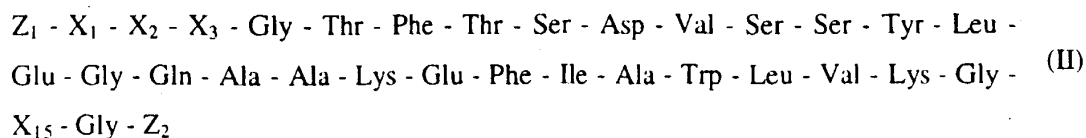
et/ou

20 X<sub>13</sub> représente un résidu d'acide aminé choisi parmi phénylalanine (Phe), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), alanine (Ala), tyrosine (Tyr),

étant entendu que :

- les résidus  $X_1$  à  $X_{15}$  ne peuvent être choisis de telle façon que le peptide obtenu soit identique au peptide naturel.
- le terme alkyle désigne une chaîne linéaire ou ramifiée de 1 à 6 atomes de carbones.
- 5 - le terme cycloalkyle représente un groupement cyclique carboné, saturé de 3 à 8 chaînons.
- l'expression "cycloalkyle fusionné" désigne un groupement bicyclique de 8 à 11 chaînons, composé d'un cycle saturé carboné fusionné avec un cycle saturé ou insaturé comportant éventuellement un ou deux hétéroatomes choisis parmi azote, oxygène ou soufre, par exemple un groupement indane, tétrahydronaphtalène ou tétrahydroquinoléine.
- 10 - le terme aryle représente un groupement phényle, naphtyle ou biphényle.
- le terme hétéroaryle représente un groupement mono ou bicyclique de 5 à 11 chaînons contenant de 1 à 4 hétéroatomes choisis parmi azote, oxygène ou soufre, par exemple un groupement furyle, pyridyle, thiényle ou indolyle.
- le terme arylcarbonyle représente un groupement  $R_a\text{-CO-}$ , le terme arylalkylcarbonyle
- 15 - représente un groupement  $R_a\text{-R}_b\text{-CO-}$ , le terme hétéroarylcabonyle représente un groupement  $R_c\text{-CO-}$ , et le terme hétéroarylalkylcarbonyle représente un groupement  $R_c\text{-R}_b\text{-CO-}$ , le terme aryloxy carbonyle représente un groupement  $R_a\text{-O-CO-}$ , le terme arylalkyloxy carbonyle représente un groupement  $R_a\text{-R}_b\text{-O-CO-}$  et le terme alkyloxy carbonyle représente un groupement  $R_b\text{-O-CO-}$ , dans lesquels  $R_a$  représente un groupement aryle tel que défini
- 20 précédemment,  $R_b$  un groupement alkyle tel que défini précédemment et  $R_c$  un groupement hétéroaryle tel que défini précédemment.
- le terme substitué affecté aux expressions précédemment définies, signifie que les groupements concernés sont substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène, ou groupement alkyle ( $C_1\text{-C}_6$ ) linéaire ou ramifié, hydroxy, alkoxy ( $C_1\text{-C}_6$ ) linéaire ou ramifié, amino, cyano,
- 25 nitro, perhalogénoalkyle ( $C_1\text{-C}_6$ ) linéaire ou ramifié,
- chaque liaison peptidique  $\text{-CO-NH-}$  peut être éventuellement remplacée par une liaison pseudopeptidique choisie parmi  $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ,  $\text{-NH-CO-}$ ,  $\text{-CO-N(CH}_3\text{)-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CO-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-S-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-SO-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH=CH-}$ ,  $\text{-CO-CH}_2\text{-NH-}$ .

2. Composés peptidiques, selon la revendication 1, représentés par la formule (II) :

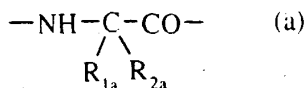


5 dans laquelle :

10  $Z_1$ , substituant du groupement aminé terminal du peptide de formule (I), représente un atome d'hydrogène, un groupement alkyle, un groupement acyle ( $C_1-C_6$ ) linéaire ou ramifié, un groupement arylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylcarbonyle éventuellement substitué, arylalkylcarbonyle éventuellement substitué, hétéroarylalkylcarbonyle éventuellement substitué, aryloxy carbonyl éventuellement substitué, arylalkyloxy carbonyl éventuellement substitué, ou alkyloxy carbonyl éventuellement substitué,

15  $Z_2$ , substituant du groupement carbonyle terminal du peptide de formule (I), représente un groupement hydroxy, alkoxy ( $C_1-C_6$ ) linéaire ou ramifié, amino (éventuellement substitué par un ou deux groupements identiques ou différents choisis parmi alkyle ( $C_1-C_6$ ) linéaire ou ramifié, aryle éventuellement substitué, hétéroaryle éventuellement substitué, arylcarbonyl éventuellement substitué, hétéroarylcarbonyl éventuellement substitué, arylalkylcarbonyl éventuellement substitué, hétéroarylalkylcarbonyl éventuellement substitué, ou par deux groupements formant avec l'atome d'azote un cycle saturé de 5 à 7 chaînons).

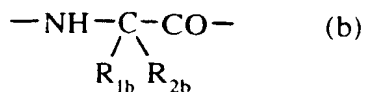
20  $X_1$ , représente un résidu d'acide aminé naturel ou non naturel de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale à caractère aromatique, représenté par la formule suivante :



dans laquelle :

25  $R_{1a}$  représente un atome d'hydrogène, et  $R_{2a}$  représente un groupement cycloalkyle fusionné avec un cycle insaturé tel que défini précédemment, et éventuellement substitué, ou un groupement aryle éventuellement substitué, arylalkyle éventuellement substitué, hétéroaryle éventuellement substitué, hétéroarylalkyle éventuellement substitué,

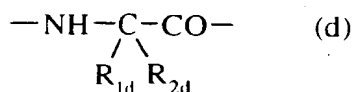
X<sub>2</sub>, représente un résidu d'acide aminé naturel ou non naturel de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale à caractère aliphatique, représenté par la formule suivante :



dans laquelle :

- 5 R<sub>1b</sub> représente un atome d'hydrogène, et R<sub>2b</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement alkyl, cycloalkyle,

X<sub>3</sub>, représente un résidu d'acide aminé naturel ou non naturel de configuration D ou L, possédant une chaîne latérale capable d'établir des interactions ioniques, représenté par la formule suivante :



dans laquelle :

R<sub>1d</sub> représente un atome d'hydrogène, et R<sub>2d</sub> représente un groupement aminoalkyle, thioalkyle, hydroxyalkyle, carboxyalkyle, guanidinoalkyle, imidazolyle, imidaolylalkyle,

X<sub>15</sub>, représente une liaison ou un résidu arginine,

- 15 ainsi que leurs sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

3. Composés peptidiques de formule (I) selon la revendication 1 tels que X<sub>15</sub> représente une liaison, ainsi que leurs sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

4. Composés peptidiques de formule (II) selon la revendication 2 tels que X<sub>15</sub> représente une  
20 liaison, ainsi que leurs sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

5. Composé de formule (I) selon la revendication 1 qui est le peptide suivant :

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - (D)-Leu - Glu - Gly -  
- Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Arg - Gly - NH<sub>2</sub>

ainsi que ses sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

5 6. Composé de formule (I) selon la revendication 1 qui est le peptide suivant :

His - (D)-Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu -  
Gly - Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

ainsi que ses sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

7. Composé de formule (I) selon la revendication 1 qui est le peptide suivant :

10 His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

ainsi que ses sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

8. Composé de formule (I) selon la revendication 1 qui est le peptide suivant :

15 Phe - (D)-Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Lys - Tyr - Leu - Glu -  
Gly - Gln - Ala - Val - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

ainsi que ses sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

9. Composé de formule (I) selon la revendication 1 qui est le peptide suivant :

His - Ala - Met - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

20 ainsi que ses sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.



10. Composé de formule (I) selon la revendication 1 qui est le peptide suivant :

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Trp - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

ainsi que ses sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

5 11. Composé de formule (I) selon la revendication 1 qui est le peptide suivant :

His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly -  
Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Val - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>

ainsi que ses sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

10 12. Procédé de préparation des composés de formule (I) selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'ils peuvent être obtenus par synthèse séquentielle sur phase solide à partir d'acides aminés protégés, par synthèse à partir de fragments peptidiques en solution, ou éventuellement par combinaison de ces deux techniques,

et si on le souhaite par introduction, selon les techniques classiques de la chimie organique, d'une ou plusieurs liaisons pseudopeptidique à tout moment de la synthèse de la séquence peptidique.

15 dérivés de formule (I) que l'on transforme, si nécessaire, en leurs sels d'addition à un acide ou à une base pharmaceutiquement acceptable.

20 13. Compositions pharmaceutiques contenant comme principe actif au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, seul ou en combinaison avec un ou plusieurs excipients ou véhicules inertes, non toxiques, pharmaceutiquement acceptables.

14. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 13 contenant au moins un principe actif selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 utiles comme agoniste du <sup>1</sup>(GLP-1) dans le traitement des pathologies liées au <sup>1</sup>(GLP-1).

- 15.** Composition pharmaceutique selon la revendication 13 contenant au moins un principe actif selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 utile dans le traitement du diabète de type II non insulino-dépendant, de l'obésité, et dans le diabète de type I.

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 557249  
FR 9804559

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	WO 91 11457 A (BUCKLEY DOUGLAS I ;HABENER JOEL F (US); MALLORY JOANNE B (US); MOJ) 8 août 1991 * le document en entier *	1-4, 12-15
X	WO 93 25579 A (PFIZER ;ANDREWS GLENN C (US); DAUMY GASTON O (US); FRANCOEUR MICHA) 23 décembre 1993 * le document en entier *	1-4, 12-15
D,X	EP 0 658 568 A (LILLY CO ELI) 21 juin 1995 * le document en entier *	1-4, 12-15
D,X	EP 0 733 644 A (LILLY CO ELI) 25 septembre 1996 * le document en entier *	1-4, 12-15
X	SVETLANA MOJSOV: "STRUCTURAL REQUIREMENTS FOR BIOLOGICAL ACTIVITY OF GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-I" INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE AND PROTEIN RESEARCH, vol. 40, no. 3 / 04, 1 septembre 1992, pages 333-343, XP000311244 * le document en entier *	1-4, 12-15
X	GEFEL D ET AL: "GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-I ANALOGS: EFFECTS ON INSULIN SECRETION AND ADENOSINE 3',5'-MONOPHOSPHATE FORMATION" ENDOCRINOLOGY, vol. 126, no. 4, 1 avril 1990, pages 2164-2168, XP000574862 * le document en entier *	1-4, 12-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K A61K

Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 janvier 1999		Groenendijk, M

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T: théorie ou principe à la base de l'invention
X: particulièrement pertinent à lui seul		E: document de brevet bénéficiant d'une date antérieure
Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
A: pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général		D: cité dans la demande
O: divulgation non-écrite		L: cité pour d'autres raisons
P: document intercalaire		&: membre de la même famille, document correspondant

1  
EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 557249  
FR 9804559

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	SUZUKI S ET AL: "COMPARISON OF THE EFFECTS OF VARIOUS C-TERMINAL AND N-TERMINAL FRAGMENT PEPTIDES OF GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 ON INSULIN AND GLUCAGON RELEASE FROM THE ISOLATED PERFUSED RAT PANCREAS" ENDOCRINOLOGY, vol. 125, no. 6, 1 décembre 1989, pages 3109-3114, XP000574778 * le document en entier * -----	1-4, 12-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 janvier 1999		Groenendijk, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1  
EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)